

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**



# Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

### Aktenzeichen:

103 46 611.8

**Anmeldetag:**

**07. Oktober 2003**

**Anmelder/Inhaber:**

**IPK / Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben; Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., 80539 München/DE; Universität Zürich, Zürich/CH.**

**Bezeichnung:**

## Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

**IPC:**

**C 12 N 15/82**

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 12. Oktober 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

SOA

**Schmidt C.**

München · Hamburg · Düsseldorf  
New York

Patentanwälte  
Dr. Walter Maiwald (München)  
Dr. Volker Hamm (Hamburg)  
Dr. Stefan Michalski (Düsseldorf)  
Dr. Regina Neufeind (München)  
Dipl.-Ing. Udo Preuss (München)  
Dipl.-Ing. Korbinian Kopf, M.A. (München)  
Dr. Norbert Hansen (München)  
Dipl.-Ing. Lutz Kietzmann LL.M. (Düsseldorf)  
Dr. Martin Huenges (München)  
Dr. Folger Glas (München)  
Dr. Vera Tiefbrunner (München)

Rechtsanwalt  
Stephan N. Schneller (München)

In Kooperation mit:  
Maiwald Inc.,  
European IP Services, New York  
Dipl.-Ing. Korbinian Kopf, M.A.  
U.S. Patent Agent

Aktenzeichen  
Neuanmeldung

Unser Zeichen  
I 7407 / RN

München,  
07. Oktober 2003

IPK / INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG

---

IPK / INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG

Corrensstraße 3, 06466 Gatersleben;

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.

Hofgartenstraße 2, 80539 München;

UNIVERSITÄT ZÜRICH

Rämistrasse 71, CH – 8006 Zürich

---

Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

---

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotorregionen, unter deren Kontrolle Transgene in Pflanzen epidermisspezifisch exprimiert werden können. Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese Promotorregionen umfassen und transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die mit diesen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, sowie Verfahren zu deren Herstellung. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Nuklein-

RN:LA:uh:ro

Postfach 330523 · 80065 München · Elisenhof · Elisenstrasse 3 · 80335 München

Tel. +49 (0)89 74 72 660 · Fax +49 (0)89 77 64 24 · <http://www.maiwald.de> · [info@maiwald.de](mailto:info@maiwald.de)

Geschäftsführer: Dr. W. Maiwald · Dr. V. Hamm · Dr. S. Michalski · Dr. R. Neufeind · Dipl.-Ing. U. Preuss · Dipl.-Ing. L. Kietzmann · HRB Nr. 111307

Kooperation mit: Dr. Schmidt-Felzmann & Koziarka Rechtsanwälte (Hamburg)

Partner: Tauche · Leutheusser-Schnarrenberger Rechtsanwälte (München · Stuttgart)

säuremoleküle umfassend einen erfindungsgemäßen Promotor und Nukleinsäuresequenzen bzw. Transgene, die Pathogenresistenz vermitteln können sowie mit diesen Nukleinsäuremolekülen transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen und Verfahren zu deren Herstellung.

Als Promotoren werden allgemein diejenigen DNA-Bereiche eines Gens bezeichnet, die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen und durch die der Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription und somit die Expressionsstärke und das Expressionsmuster des kontrollierten Gens festgelegt werden. An die Promotoren binden die RNA-Polymerase und spezifische, die RNA-Polymerase aktivierende Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zusammen mit dem basalen Transkriptionskomplex zu initiieren. Die Wirksamkeit der Promotoren wird häufig durch zusätzliche DNA-Sequenzen, die Enhancer-Sequenzen, gesteigert und reguliert, deren Position im Gegensatz zu der der Promotoren nicht festgelegt ist. Diese regulatorischen Elemente können stromaufwärts, stromabwärts oder in einem Intron des zu exprimierenden Gens liegen.

In der rekombinanten DNA-Technologie werden Promotoren in Expressionsvektoren eingesetzt, um die Expression eines Transgens zu steuern, das in der Regel nicht das natürlicherweise durch den Promotor regulierte Gen ist. Dabei kommt es wesentlich auf die Spezifität des Promotors an, die bestimmt, zu welchem Zeitpunkt, in welchen Gewebetypen und in welcher Intensität ein gentechnisch übertragenes Gen exprimiert wird.

In der Pflanzenzucht wird die rekombinante DNA-Technologie häufig eingesetzt, um bestimmte nützliche Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen, was zu einem höheren Ertrag, z. B. durch erhöhte Pathogenresistenz, oder zu verbesserten Eigenschaften der Ernteprodukte führen soll. Dabei ist es häufig wünschenswert, dass das übertragene Gen nicht ubiquitär exprimiert wird, sondern nur in den Geweben, in denen die Transgenaktivität gewünscht wird, da sich die Anwesenheit des Transgenprodukts in manchen Geweben negativ auf normale physiologische Prozesse auswirken kann. So konnte etwa gezeigt werden, dass

die Überexpression einer anionischen Peroxidase unter der Kontrolle des 35S-Promotors zum Welken von transgenen Tabakpflanzen führt, weil weniger Wurzelwachstum stattfindet und sich daher auch weniger Wurzelmasse bildet (Lagrimini et al. (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol Biol. 33 (5), S. 887-895). Die Überexpression der spi2-Peroxidase unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors führt zu einer reduzierten Epicotylbildung und einem reduzierten Längenwachstum verglichen mit Kontrollpflanzen (Elfstrand, M. et al. (2001) Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene spi 2 in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. Plant Cell Reports 20 (7), S. 596-603). Abgesehen von negativen Effekten auf physiologische Prozesse soll in der Resistenzzüchtung häufig vermieden werden, dass das Transgenprodukt auch in den geernteten Pflanzenteilen vorliegt.

Deshalb wurden in den vergangenen Jahren Promotoren isoliert, die entweder gewebespezifisch oder induzierbar wirken. Zu den gewebespezifischen Promotoren gehören etwa samen-, knollen- und fruchtspezifische Promotoren. Die induzierbaren Promotoren können beispielsweise durch chemische Induktion, durch Lichtinduktion oder andere Stimuli aktiviert werden.

Es ist auch wünschenswert, die Genexpression spezifisch in der Epidermis zu modulieren. Die Epidermis stellt das Abschlussgewebe der oberirdischen Organe höherer Pflanzen dar. Als solches bestehen die Aufgaben der Epidermis darin, einerseits den Wasser- und Stoffaustausch der Pflanze zu ermöglichen und andererseits das Eindringen von Pathogenen in die Pflanze zu verhindern. Durch eine veränderte Genexpression in der Epidermis mit Hilfe geeigneter Promotoren und von ihnen gesteuerter Gene könnten diese Funktionen gezielt moduliert werden.

Epidermisspezifische Promotoren wurden in dikotyledonen Pflanzen bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor des CER6- (CUT1-) Gens aus Arabidopsis, das für

ein kondensierendes Enzym bei der Wachssynthese kodiert, die epidermisspezifische Expression eines  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens bewirken kann (Hooker et al. (2002), Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis, Plant Physiol. 129(4), S. 1568-1580; Kunst et al. (2000), Expression of the wax-specific condensing enzyme CUT1 in Arabidopsis, Biochem. Soc. Trans. 28(6), S. 651-654).

Jedoch ist es bisher nicht gelungen, geeignete epidermisspezifische Promotoren in monokotyledonen Pflanzen, die sich für die Expression von Transgenen in Monokotyledonen, insbesondere Poaceen (Süßgräsern), besonders gut eignen, zu identifizieren. Deshalb wurden bisher konstitutive Promotoren wie der Ubiquitin-Promotor aus Mais verwendet, um Proteine in der Epidermis zu exprimieren (siehe z. B. Oldach et al. (2001), Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat, Mol Plant Microbe Interact. 14(7), S. 832-838). Dies kann aber, wie oben beschrieben, zu unerwünschten Nebeneffekten bei den transgenen Pflanzen aufgrund der Anwesenheit des Transgenprodukts in anderen Geweben bzw. Organen als der Epidermis führen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel bereitzustellen, die eine epidermisspezifische Genexpression in Monokotyledonen, bevorzugt in Getreidepflanzen, ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis, umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1) stammende Sequenz, und eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz. GSTA1 bezieht sich auf Gene, wie sie in Dudler et al. (1991), A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases, Mol. Plant Microbe Interact. 4(1), S. 14-18 beschrieben sind. Insbesondere handelt es sich bei



diesen Genen um Gene aus Weizen, es kann sich aber auch um homologe Gene aus anderen Getreidepflanzen, vor allem Gerste, mit vergleichbarem Expressionsmuster und ähnlichem Genprodukt handeln. WIR1a bezeichnet Gene, wie sie in Bull et al. (1992), Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense, Mol. Plant Microbe Interact. 5(6), S. 516-519, beschrieben sind.

Bevorzugt handelt es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2.

Zwischen der ersten und der zweiten Sequenz können weitere, untranslatierte Sequenzen liegen, die eine Länge von 10bp bis 1000bp, bevorzugt von 20bp bis 800bp, besonders bevorzugt von 30bp bis 500bp und am meisten bevorzugt zwischen 40bp und 300bp aufweisen.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Promotorregion um eine Promotorregion, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Nukleinsäuresequenz umfassen;
- b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen oder
- c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten Bedingungen mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz hybridisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Promotorregion eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die die zur Expression einer kodierenden Sequenz (Transgen) notwendigen regulatorischen Sequenzen umfasst. Regulatorische Sequenzen bilden denjenigen Teil eines Gens, der die Expression einer kodierenden Sequenz bestimmt, also vor allem das Expressionsniveau und -muster. Die regulatorischen Sequenzen besitzen mindestens ein

Sequenzmotiv, an das spezifische Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase binden, zum Transkriptionskomplex assemblieren und die Transkription der von der Promotorregion kontrollierten Nukleinsäuresequenz wirksam initiieren.

Die erfindungsgemäßen Promotorregionen basieren auf der Beobachtung, dass durch Fusion des Promotors des GSTA1-Gens aus Weizen mit intronischen Sequenzen des WIR1a-Gens aus Weizen Promotoren mit neuen Eigenschaften hergestellt werden können.

In transienten Reporterassays in Weizenblättern mit einem  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* als Reporter gen wurden verschiedene Kombinationen des WIR1a-Promotors und – Introns und des GST-Promotors getestet. Es zeigte sich überraschenderweise, dass GST-Promotor und WIR1a-Intron einen synergistischen Effekt auf die Reporter-Gen-Aktivität ausüben. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität war vergleichbar mit der durch den ubiquitär exprimierten 35S-Promotor erzielten transkriptionellen Aktivität.

Unter dem Begriff „epidermisspezifisch“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass eine unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehende Nukleinsäuresequenz in der Spross-epidermis von Pflanzen exprimiert wird. Insbesondere ist Epidermisspezifität im Sinne der vorliegenden Erfindung auch dann gegeben, wenn die erfindungsgemäße Promotorregion die Expression eines Fremdgens in der Epidermis im Vergleich zu anderen Zelltypen begünstigt und in der Epidermis eine signifikant, wie mindestens 2-fach, bevorzugt mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10- und am meisten bevorzugt 50-fach erhöhte Expression bewirkt. Die Expressionshöhe kann mit üblichen in situ-Nachweistechiken bestimmt werden.

Der Begriff „pflanzliche Epidermis“ ist dem Fachmann geläufig. Ergänzende Informationen sind in jedem Pflanzenanatomie oder –physiologiebuch zu finden, wie etwa in Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage 2002, Spektrum Akademischer Verlag.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass eine Promotorregion, die sowohl regulatorische Sequenzen aus dem GSTA1-Gen aus Weizen als auch Intron-Sequenzen aus dem WIR1a-Gen aus Weizen umfasst, eine epidermisspezifische Expression einer unter ihrer Kontrolle stehenden kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirkt.

Neben einer Promotorregion, die die unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotorregionen, die die funktionalen Teile dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine epidermisspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirken.

Unter einem „funktionalen Teil“ werden in diesem Zusammenhang Sequenzen verstanden, an die trotz leicht abweichender Nukleinsäuresequenz noch der Transkriptionskomplex binden und epidermisspezifische Expression bewirken kann. Funktionale Teile einer Promotorsequenz umfassen auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist. Unter einem funktionalen Teil versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Varianten der in SEQ ID Nr. 3 angegebenen Sequenz der Promotorregion. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Funktionale Teile der Promotorregionen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der SEQ ID Nr. 3 sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

Der verwendete Promotor enthält in jedem Fall eine TATA-Box (Positionen 2163 bis 2169 in SEQ ID Nrn. 1 und 3) und bevorzugt auch zwei CAAT-Boxen (Positionen 1047 bis 1051 bzw. 1895 bis 1899 in SEQ ID Nrn. 1 und 3). Weiterhin ist mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei und drei, besonders bevorzugt mindestens vier, fünf und sechs, und am meisten bevorzugt sieben und acht der folgenden Sequenzmotive im Promotor enthalten:



- a) GTGGGGG
- b) ACGTGGA
- c) TCCACCT
- d) TATCCAT
- e) CATGCATG
- f) TGTAAAG
- g) CCTACCA
- h) AATAGTA

Bevorzugt liegen die Sequenzmotive an den Positionen, die den folgenden Positionen in SEQ ID Nrn. 1 und 3 entsprechen:

- a) 185-191 und 217-223bp
- b) 455-461bp
- c) 508-514bp
- d) 564-570bp
- e) 1514-1521bp
- f) 1520-1526bp
- g) 1569-1575bp
- h) 1610-1616bp

Gemessen werden kann die Promotoraktivität von Varianten der Promotorregion mit Hilfe von Markergenen, deren kodierende Sequenz unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorregion steht. Geeignete Markergene sind beispielsweise das  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli*, ein Fluoreszenzgen wie etwa das Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen aus *Aequoria victoria*, das Luziferase-Gen aus *Photinus pyralis* oder das  $\beta$ -Galaktosidase-(lacZ)-Gen aus *E. coli*. Die absolute Promotoraktivität wird bestimmt durch Vergleich mit

einer Wildtyp-Pflanze. Die Gewebe- bzw. Zellspezifität lässt sich leicht durch Vergleich der Expressionsraten der oben genannten Markergene in den jeweiligen Geweben bzw. Zellen bestimmen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Promotorregionen mit einer Nukleinsäuresequenz, die mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Begriff „Hybridisierung unter stringenten Bedingungen“ bedeutet im Zusammenhang dieser Erfindung, dass die Hybridisierung *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt wird, die stringent genug sind, um eine spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Solche stringenten Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Allgemein bedeutet „spezifisch hybridisieren“, dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z. B. Gesamt-) DNA oder RNA vorliegt. Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht allgemein für Bedingungen, unter denen eine Nukleinsäuresequenz präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen. Stringente Bedingungen sind z. T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt ( $T_m$ ) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH liegt. Die  $T_m$  ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand hybridisieren. Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M

Natriumionen-Konzentration (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt und die Temperatur mindestens 30 °C für kurze Moleküle (also z. B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen durch Zugabe destabilisierender Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.

Geeignete stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise auch beschrieben in Sambrook et al., vide supra. So kann die Hybridisierung etwa unter den folgenden Bedingungen stattfinden:

- Hybridisierungspuffer: 2x SSC, 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1), 0,1% SDS, 5mM EDTA, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 250µg/ml Heringssperma-DNA; 50µg/ml tRNA oder 0,25M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C bis 68°C
- Waschpuffer: 0,2x SSC, 0,1% SDS bei einer Waschtemperatur von 65°C bis 68°C

Vorzugsweise weisen derartige Promotorvarianten eine Sequenzidentität von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Promotorsequenz oder Teilen davon auf, bezogen auf die gesamte in SEQ ID Nr. 3 gezeigte DNA-Sequenz.

Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz bestimmt. Wenn zwei unterschiedlich lange Nukleinsäuresequenzen miteinander verglichen werden, bezieht sich die Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nukleotidreste der kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den entsprechenden Nukleotidresten der längeren Sequenz.

Sequenzidentitäten werden üblicherweise über verschiedene Alignment-Programme, wie z. B. CLUSTAL festgestellt. Allgemein stehen dem Fachmann zur Bestimmung der Sequenzidentität geeignete Algorithmen zur Verfügung, z. B. auch das Programm, das unter

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (z. B. der Link „Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

Die oben für SEQ ID Nr. 3 angegebenen prozentualen Identitätsgrade gelten ebenso für die in SEQ ID Nm. 1 und 2 gezeigten ersten und zweiten Sequenzen der erfindungsgemäßen Promotorregion.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die erfindungsgemäße Promotorregion die gesamte unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Sequenz von 2552 Nukleotiden auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch chimäre Gene aus der erfindungsgemäßen Promotorregion und einer kodierenden Sequenz, deren Expression, die natürlicherweise nicht durch die erfindungsgemäßen Promotorregion reguliert wird, durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird, in operativer Verknüpfung sowie rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese chimären Gene enthalten.

Der Begriff „Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird“ bedeutet, dass die Expression der Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion in den Zellen, in denen die Promotorregion aktiv ist, um mindestens den Faktor fünf, bevorzugt mindestens den Faktor 10 und besonders bevorzugt mindestens den Faktor 50 gegenüber Wildtyp-Zellen gesteigert werden kann.

Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz reguliert wird, kann es sich um die kodierende Region eines Transgens handeln, z. B. eines Resistenzgens, dessen Genprodukt in der Epidermis erwünscht ist. Durch die Expression des Transgens kann der Gehalt des von ihm kodierten Genprodukts mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 10 und am meisten bevorzugt mindestens um den Faktor 50 erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Promotorregion kann aber auch in RNAi-Konstrukten zur RNA-Interferenz eingesetzt werden, um das epidermisspezifische Silencing bestimmter Gene zu erreichen, deren Genprodukte in der Epidermis nicht oder in geringerem Ausmaß als üblich anwesend sein sollen. Letzteres kann natürlich auch mit klassischen antisense- oder Kosuppressionskonstrukten unter Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorregionen erreicht werden. Die Expression des endogenen Gens wird durch die Silencing-Konstrukte um mindestens 50%, bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 90% und besonders bevorzugt um mindestens 95% verringert.

In einem Konstrukt, das zur RNA-Interferenz verwendet werden soll, liegen üblicherweise palindromische DNA-Sequenzen vor, die nach der Transkription doppelsträngige RNA bilden. Diese doppelsträngige RNA wird durch das Dicer-Enzym zu kürzeren RNA-Stücken prozessiert, die an eine endogene RNA binden und deren Abbau mit Hilfe des RISC (RNA-induced silencing complex) bewirken (Hannon (2002) RNA interference, Nature, Bd. 418, S. 244-251).

Der Effekt der Gen-Silencing-Konstrukte auf die Expression des endogenen Gens kann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden, die dem Fachmann wohl bekannt sind. So stehen zur Untersuchung des RNA-Levels Northern-Blot- und RT-PCR-Verfahren zur Verfügung, das Protein kann durch Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzen oder, sofern es sich bei dem Protein um ein Enzym handelt, Enzymassays nachgewiesen werden.

Unter dem Begriff „Transgen“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen Gene zusammengefasst, deren Genprodukte in der Epidermis bereitgestellt werden sollen, bzw. beim Gen-Silencing unterdrückt werden sollen.



Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, handelt es sich bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, da die Epidermis die erste Barriere darstellt, die von einem Pathogen beim Eindringen in die Pflanze überwunden werden muss.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ ein Vektor verstanden, der ein erfindungsgemäßes chimäres Gen oder eine erfindungsgemäße Promotorregion enthält und die promotor-abhängige Expression der unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehenden Nukleinsäuresequenz in Pflanzenzellen und Pflanzen bewirken kann. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül zusätzlich transkriptionelle Terminationssequenzen. Unter „transkriptionellen Terminationssequenzen“ werden dabei DNA-Sequenzen verstanden, die am stromabwärts-Ende einer kodierenden Sequenz liegen und die RNA-Polymerase zum Stoppen der Transkription veranlassen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression einer durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierten Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in der die erfindungsgemäße Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Sequenz vorliegt,
- b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Das

chimäre Gen kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und daraus gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

Wie bereits erwähnt, stehen für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten, die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie gehören. Die biolistische Gentransfermethode wird vor allem bei monokotyledonen Pflanzen verwendet. Hier findet der Fachmann nützliche Informationen zur Durchführung z.B. in Vasil et al. (1992) Bio/Technology, 10, S. 667-674; Vasil et al. (1993) Bio/Technology, 11, S. 1153-1158; Nehra et al. (1994) Plant J. 5, S. 285-297; Becker et al. (1994) Plant J., 5, S. 299-307; Altpeter et al. (1996) Plant Cell Reports 16, S. 12-17; Ortiz et al. (1996) Plant Cell Reports 15, S. 877-81; Rasco-Gaunt et al. (2001) J. Exp. Bot. 52; S. 865-874.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden.

Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens empfehlenswert. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Wird z.B. zur Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden zur Transformation Agrobakterien verwendet, muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können allerdings nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren dagegen können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid enthalten, welches das chimäre Gen innerhalb der T-DNA trägt, welche in die Pflanzenzelle übertragen wird. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für monokotyledone Pflanzen müssen für einen effektiven

Agrobakterium-vermittelten Gentransfer abgewandelte Protokolle angewandt werden, wie sie etwa in Cheng et al. (1997) Plant Physiol. 115, S. 971-980; Khanna and Daggard (2003) Plant Cell Reports 21, S. 429-436; Wu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 659-668; Hu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 1010-1019, beschrieben sind. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker oder Screeningmarker (wie GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgene Pflanzen erwünscht sind, stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation oder Sequenz-spezifische Rekombinasen.

Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich molekular-

biologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit und Gewebespezifität der eingeführten Nukleinsäuresequenz, deren Expression von dem erfindungsgemäßen Promotor kontrolliert wird, bzw. der von ihr beeinflussten endogenen RNAs und Proteine untersucht werden.

Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, die eine durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierte Nukleinsäuresequenz enthalten und diese epidermisspezifisch exprimieren.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um Monokotyledonen, insbesondere Getreidepflanzen wie Roggen, Mais und Hafer, besonders bevorzugt um Weizen oder Gerste, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze. Aber auch für andere Poaceen (Süßgräser) wie z. B. Futtergräser kann die erfindungsgemäße Promotorregion zur Herstellung entsprechender Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression von Transgenen eingesetzt werden.

Unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen, epidermisspezifischen Promotors können Gene für die Produktion epikutikulärer Wachse exprimiert werden, um die Trockenheitstoleranz der Pflanzen zu erhöhen. Außerdem können unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors Gene für die Produktion von Anthocyanen oder anderen UV-absorbierenden Substanzen zur Erhöhung der UV-Resistenz exprimiert werden. Wie oben bereits ausgeführt, werden bevorzugt Pathogen-Resistenzgene unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors exprimiert.

Als Pflanzenpathogene werden unter anderem Bakterien, Viren und Pilze bezeichnet, die Pflanzen infizieren und dadurch den Stoffwechsel der Pflanze negativ beeinflussen.



Zu diesen Pflanzenpathogenen gehören Pilze, die bei Getreidepflanzen wie Weizen und Gerste unter anderem die Krankheiten Echter Mehltau und Halmbruchkrankheit auslösen. Diese Krankheiten können abhängig von der Befallsstärke erhebliche Ertragsverluste (bis zu 50%) verursachen.

Traditionell werden die oben genannten sowie weitere pflanzliche Pilzerkrankungen durch den Einsatz von Fungiziden bekämpft, die die bekannten Nachteile, wie Grundwassergängigkeit und Akkumulation in der Nahrungskette, besitzen.

In den letzten Jahren wurden aber auch einige Gene identifiziert, die Resistenz gegen einen bestimmten oder gegen mehrere Erreger vermitteln können. Der Begriff „Vermittlung von Pathogenresistenz“, wie er hier verwendet wird, bedeutet, dass Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene erhöht ist, gegenüber Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene normal ist, weniger empfänglich für die Infektion mit bestimmten Pathogenen sind. Zu den Genen, die Pathogenabwehr vermitteln, gehören auch solche Gene, deren Expression durch Infektion mit einem Pathogen angeschaltet wird.

Zu diesen Genen gehören Peroxidasen und Oxalat-Oxidasen. Die Oxalat-Oxidasen, die zu der Familie der germinartigen Proteine gehören, katalysieren die Oxidation von Oxalat, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. Das Wasserstoffperoxid wirkt mikrobizid und kann die Lignifizierung der Zellwände fördern, wodurch das Eindringen von Schädlingen verhindert wird. Außerdem kann es in geringen Konzentrationen hypersensitiven Zelltod hervorrufen. Die Peroxidasen verwenden entweder molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, um zelluläre Substrate zu oxidieren und dadurch zu entgiften.

Pathogene, gegenüber denen die Expression der Oxalat-Oxidasen und Peroxidasen in der Epidermis von Pflanzen Resistenz vermitteln kann, schließen zum Beispiel ein: Echter Mehltau, *Fusarium* spp., *Rhynchosporium secalis* und *Pyrenophora teres*.

Weitere Gene, die in der Lage sind, Resistenz gegen Pathogene zu vermitteln, sind Chitinasen, Ag-AFP, GSTA1 und WIR1a.

Durch die Expression der für diese Enzyme kodierenden Nukleinsäuresequenz in der Epidermis von transgenen Pflanzen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Promotorregion können Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz erhalten werden.

Im Gegensatz zu den Pathogenresistenz vermittelnden Genen gibt es auch pflanzeigene Gene, die das Eindringen eines Pathogens fördern. Zu diesen gehört das Mlo-Gen, das für einen Sieben-Transmembran-Rezeptor kodiert, der das Eindringen des Mehltau-Pilzes in die Epidermis zu fördern scheint. In diesem Fall ist es sinnvoll, mit der Expression des Mlo-Gens zu interferieren, um das Eindringen von Pilzen in die Pflanze zu verhindern. Dies kann z. B. mit Hilfe der oben beschriebenen RNAi-Methode erfolgen. Dass die Interferenz mit der Expression des Mlo-Gens geeignet ist, das Eindringen des Mehltaupilzes in die Pflanze zu verhindern, wurde in vitro an Blattsegmenten aus Gerste gezeigt, die mit Wolfram-Teilchen beschossen wurden, die mit Mlo-dsRNA beschichtet worden waren (Schweizer et al. (2000), Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals, The Plant Journal, 24 (6), S. 895-903). Jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, dass die epidermis-spezifische Interferenz mit der Mlo-Expression in transgenen Pflanzen den gleichen Effekt hat.

Weitere pflanzliche Gene, die die Interaktion eines Pathogens mit der Pflanze vermitteln können und dadurch das Eindringen des Pathogens in die Pflanze fördern können, sind beispielsweise Aminosäuren- oder Zuckertransporter oder Invertasen. Diese Gene eignen sich ebenfalls als Angriffspunkte für das Gen-Silencing.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung pathogen-resistenter Pflanzen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in dem der erfindungsgemäße Promotor in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, vorliegt,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Pathogenresistenz vermittelnden Nukleinsäuresequenz um die kodierende Region eines Peroxidase- oder Oxalat-Oxidase-Gens oder um eine Sequenz, die mit der endogenen Mlo-RNA interferiert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung und sollten nicht einschränkend verstanden werden.

#### Abbildungen:

- 1) Nukleinsäuresequenz des GSTA1-Promotors (SEQ ID Nr. 1)
- 2) Nukleinsäuresequenz des WIR1a-Introns (SEQ ID Nr. 2)
- 3) Nukleinsäuresequenz der bevorzugten Promotorregion (SEQ ID Nr. 3)
- 4) Nukleinsäuresequenz der TAPERO (Peroxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 4)
- 5) TAPERO-Expressionsvektor pPS41
  - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 5)
  - b) Vektorkarte
- 6) Nukleinsäuresequenz der Germin 9f-2.8 (Oxalat-Oxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 6)
- 7) Germin-Expressionsvektor pPS24
  - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 7)
  - b) Vektorkarte

- 8) Sequenz des Mlo-RNAi-Konstrukts (SEQ ID Nr. 8)
- 9) Mlo-RNAi-Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi
  - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 9)
  - b) Vektorkarte
- 10) In situ Oxalatoxidase-Aktivität in pPS24-transgenen Pflanzen
- 11) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen
  - a) im Northern Blot
  - b) im Western Blot
- 12) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pPS41-transgenen Pflanzen
- 13) Sprosswachstum von pPS41-transgenen Pflanzen
- 14) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen

**Beispiele:**

In den nachfolgenden Beispielen wurden molekularbiologische Standardmethoden wie *E.coli* Transformation, Restriktionsverdau, Ligation, DNA Extraktion, PCR etc., wie sie im Stand der Technik bekannt sind, gemäss Sambrook et al. (2001), vide supra, durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurde „proofreading“ *Pwo* Polymerase (Roche) verwendet.

- 1) Herstellung des Promotorkonstruktes aus GSTA1-Promotor und WIR1a-Intron (pPS18)  
Die Herstellung erfolgte mehrstufig über folgende Vorläuferkonstrukte: pPS1, pPS3, pPS15.  
Alle Konstrukte enthielten das GUS Reportergen, um sie direkt im transienten Assay testen zu können.

pPS1:

Ein 1.9 kb Promotorfragment des WIR1a Gens wurde mit PstI aus einem rekombinanten pBluescript Klon herausgeschnitten und in die PstI Schnittstelle einer Expressionskassette vor das GUS-Gen kloniert. Die Expressionskassette basierte auf pBluescript und enthielt das GUS-Gen gefolgt vom Transkriptionsterminator des Weizen GSTA1 Gens. Da das GUS-Gen und der GSTA1-Transkriptionsterminator in den verwendeten finalen Konstrukten (siehe Beispiel 2) nicht mehr enthalten sind, wird auf eine detaillierte Beschreibung dieser Expressionskassette verzichtet. Das resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion.

pPS3:

Mit den Adaptor-Primern 5' ATA TAT CTG CAG GGA GCC ACG GCC GTC CAC und 5' TAT CCC GGG CCC GTG CCT GGA CGG GAA wurde ein PCR Fragment von ca. 240 bp erzeugt und dessen Enden mit SmaI und PstI geschnitten (auf Adaptor). Als PCR „template“ diente der genomische WIR1a Klon. Das PCR Fragment enthielt die letzten 15 Aminosäuren des 1. Exons von WIR1a und das Intron inklusive „splice site“ Akzeptor und wurde in pPS1, geschnitten mit PstI (partiell) und SmaI und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, ligiert. Das resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion mit dem WIR1 Intron vor dem GUS Gen. Zudem wurde eine Deletion von Aminosäuren Nr. 18-35 des ersten Exons von WIR1a eingeführt, um die Sekretion des WIR1a::GUS Fusionsproteins (durch Entfernen des Signalpeptids) zu verhindern.

pPS15:

Der WIR1a Promotor wurde durch ein PCR Fragment des GSTA1 Promotors ersetzt. Zu diesem Zweck wurde pPS3 mit *XhoI* und *SnaBI* (partiell) verdaut und die Vektorbande über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das GSTA1 Promotorfragment von ca. 2.3 kb Länge wurde mit den Adaptor-Primern 5'ATA TAT CTC GAG TCT AGA ACT AGT GGA TCC und 5'ATA TAT TAC GTA GTT TGT CCG TGA ACT TCA aus dem genomischen GSTA1 Klon mittels PCR amplifiziert und an den Enden mit *XhoI* und *SnaBI* geschnitten. Das PCR



Fragment wurde mit der geleluerten pPS3 Bande ligiert, resultierend in einer translationellen Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

pPS18:

pPS15 wurde mit *Pst*I und *Sna*BI (partiell) verdaut, die Vektorbande über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (5'GTA CAC AGG CAG CTA GCT CTC GAA ACC TCG CTC GAA ACG CA plus 5'CAT GTG TCC GTC GAT CGA GAG CTT TGG AGC GAG CTT TGC GT) ligiert. Dies ersetzte den Teil des WIR1a Gens um den Translationsstart (46 bp upstream bis 53 bp downstream des Translationsstarts) mit 42 bp der 5'UTR des WIR1a Gens ohne das Translationsinitiationskodon ATG. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

## 2) Herstellung der verwendeten Konstrukte

### a) Expressionsvektor pPS24 (Oxalat-Oxidase-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Ein *Hind*III/*Sph*I Fragment von 745 bp Länge des Weizen gf-2.8 Gens (Oxalat-Oxidase; Acc. Nr. M63223) enthaltend den gesamten offenen Leserahmen (ORF) wurde in die pflanzliche Expressionskassette pGY1 subkloniert, was im Konstrukt pGermin (beschrieben in Schweizer et al., 1999) resultierte. Für diese Klonierung wurde das Oxalat-Oxidase-Fragment in einen Zwischenvektor ligiert, um das Fragment mittels der Restriktionsschnittstellen BamHI und PstI in pGY1 ligieren zu können. Aus pGermin wurde ein *Sma*I/*Eco*RI Fragment von ca. 1 kb Länge, enthaltend das Oxalat-Oxidase-Gen und den CamV 35S Terminator, in den *Sma*I/*Eco*RI-geschnittenen und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigten pPS18 Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit dem Oxalat-Oxidase-Gen unter der Kontrolle

des GstA1 Promotors. Gegenüber pPS18 enthielt das Konstrukt nicht mehr den GstA1 Transkriptionsterminator, sondern denjenigen des CamV 35S Gens.

b) Expressionsvektor pPS41 (TAPERO-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Aus pWIR3 (enthaltend eine transkriptionelle Fusion zwischen dem CamV 35S Promotor und TAPERO; Schweizer et al., 1999) wurde ein TAPERO-Fragment von ca. 1.2 kb Länge durch Restriktionsverdau mit SmaI und PstI isoliert. Das TAPERO-Fragment wurde in Vektor pPS24, der mit SmaI und PstI (partiell) verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt wurde, ligiert. Dies resultierte in einer transkriptionellen Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit dem TAPERO Gen (Acc. Nr. X56011), unter der Kontrolle des GstA1 Promotors, in dem das Oxalat-Oxidase Gen durch das TAPERO Gen ausgetauscht wurde. Wie pPS24 enthält pPS41 den Transkriptionsterminator des CamV 35S Gens.

c) Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi (Expression des Mlo-RNAi-Konstrukts unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Zunächst wurde das im Vektor pGEM-Teasy subklonierte 3. Intron des *Mla1* Resistenzgens aus Gerste (ca. 1.1 kb) mittels *EcoRI* und *PstI* isoliert und in den ebenfalls *EcoRI* und *PstI* geschnittenen Vektor pBSw41 (pBluescript-Derivat mit partieller *TaMlo1* cDNA, kloniert von Candace Elliott im Rahmen ihrer Dissertation; GenBank accession no. AF361933) ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde das *Mla1* Intron zusammen mit einem Teil der codierenden Sequenz des *TaMlo1*-Gens als ca. 1.55 kb *PstI*/*MscI*-Fragment isoliert (= Fragment 1). Parallel hierzu wurde per PCR aus dem Plasmid pBSw41 mit den Oligonukleotiden T3 (Standard-Sequenzier-Primer für pBluescript) und TaMlo1-1 (5' GTC GCA TGC CTG TCC ACA CGA AAT GTG C 3', *SphI* Restriktionsschnittstelle unterstrichen) ein ca. 450 bp großes Fragment amplifiziert. Nachfolgend wurde das PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *SphI* verdaut (= Fragment 2). Der Vektor pPS24 (Promotor + Oxalat-Oxidase, siehe oben) wurde mittels Restriktionsverdau mit *SmaI* und *SphI* geöffnet und das

herausgeschnittene Oxalat-Oxidase-Genfragment verworfen. In einer Drei-Komponenten-Ligation wurden sodann die oben beschriebenen Fragmente 1 und 2 in den *SmaI/SphI* geschnittenen Vektor pPS24 ligiert. Bei dieser Ligation sind die Enden der *MscI* und *SmaI* geschnittenen Komponenten kompatibel, da es sich bei beiden um sogenannte „stumpfe Enden“ (blunt ends) handelt. Das resultierende Konstrukt (pTaMlo1 RNAi) enthält ca. 300 bp des *TaMlo1*-Gens sowie ca. 150 bp Polylinker/Adaptor-Sequenz als „inverted repeats“, separiert durch das *MlaI*-Intron. Die Kontrolle dieser Transkriptionseinheit unterliegt dem GstA1 Promotor.

Anmerkung: Das hier aus historischen Gründen als *TaMlo1* bezeichnete Gen erhielt später die Bezeichnung *TaMloA1* (Elliott *et al.*, 2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1069-1077 (2002).

### 3) Transformation der Weizenpflanzen

Weizenpflanzen (cv. Bobwhite) wurden in Phytokammern für 40 Tage bei 15°C tagsüber und 12°C nachts unter Kurztagbedingungen (10h/d, ca. 600 µE) und nachfolgend im Gewächshaus bei 18/16°C und einer Photoperiode von mindestens 16 h angezogen. Die Ähren wurden entweder unmittelbar verwendet oder bis zu 5 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die von der Ähre abgenommenen Karyopsen wurden für 2 Minuten mit 70% Ethanol und dann für 15 bis 20 Minuten in 5% Natriumhypochlorid-Lösung/ 0,1% Tween 20 oberflächensterilisiert und schließlich viermal mit sterilem Aqua bidest gewaschen.

Unreife Embryonen mit einer Größe von 0,5 bis 1,5 mm wurden unter sterilen Bedingungen aus den Karyopsen herauspräpariert und mit dem Scutellum nach oben auf Kallusinduktions-Medium in Petrischalen aufgelegt (Basismedium nach Murashige Skoog (1962) mit 2 mg/l 2,4-D, 40 g Maltose-Monohydrat, 500 mg/l L-Glutamin, 100 mg/l Caseinhydrolysat, 5 µM CuSO<sub>4</sub> und 0,25% Phytigel). Die Kulturen wurden bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Fünf bis sieben Tage nach Isolierung der Embryonen erfolgte die biolistische Transformation. Vier bis sechs Stunden vor dem Partikelbeschuss wurden die bereits proliferierenden Embryonen auf neues Medium mit verringertem Wasserpotenzial übertragen (wie oben, supplementiert mit 0,3 M Mannitol) und bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Das Plasmid pAHC20 (Christensen and Quail 1996), das das Phosphinothricinacetyltransferase-codierende *bar*-Gen enthält, wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit einem zu co-transformierenden Vektor gemischt. Insgesamt wurden dann 10 µl Plasmid-DNA-Lösung auf die Partikel von 25 µl einer 60 mg/l Goldsuspension präzipitiert. Für einen Beschuss wurden 30 µg Partikel in 5 µl Ethanol auf einen Makrocarrier aufgetragen. Der Beschuss erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der DuPont PDS-1000/He.

Zwölf bis 16 Stunden nach dem Partikelbeschuss wurden die Explantate auf neues Kallusinduktions-Medium (wie für die Vorkultur der Embryonen) übertragen und 10 Tage bei 25°C im dunkeln inkubiert.

Die Kalli wurden danach auf Differenzierungsmedium übertragen (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 5 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,25% Phytigel und 3 mg/l Bialaphos) und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C inkubiert.

Nach 2 Wochen erfolgte die Übertragung der nicht verbräunten Kalli auf Regenerationsmedium (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 0,25% Phytigel und 4 mg/l Bialaphos) und eine weitere Inkubation bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C.

Nach weiteren 2 Wochen wurden die entstandenen Sprosse vereinzelt, in Kulturröhrchen mit Regenerationsmedium übertragen und bei einer Photoperiode von 16h bei 200  $\mu$ E und 25°C weiterkultiviert.

Die Identifizierung transgener Regenerate erfolgte per PAT-Aktivitätstest von Blattextrakten nach Spencer et al. (1990) bzw. durch Amplifizierung Transgen-spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA der Kandidatenpflänzchen und/oder Southern Blot unter Verwendung einer entsprechenden Sonde.

Die Transformationseffizienz der Methode lag in Abhängigkeit von der Qualität des Ausgangsmaterials zwischen 0,5 bis 3 transgenen Pflanzen pro 100 kultivierten Embryonen.

4) In situ Oxalat-Oxidase-Aktivität in Pflanzen mit dem pPS24-Konstrukt  
Blattsegmente von Bobwhite Wildtyppflanzen oder von pPS24-transgenen Weizenpflanzen der T3 Generation wurden unter Vakuum mit Oxalat-Oxidase-Nachweislösung (2.5 mM Oxalsäure, 3.5 mM freies EDTA, 0.6 mg/ml 4-Chlor-1-Naphthol, 50  $\mu$ g/ml Peroxidase aus Meeretich, 20% v/v Ethanol, mit Tris Base auf pH 4.0 eingestellt) infiltriert und über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Entfernen der Nachweislösung wurden die Blätter für weitere 24 h bei +4°C in H<sub>2</sub>O inkubiert. Danach wurden die Blätter von Hand mittels Skalpell in dünne Segmente querschnitten und mikroskopiert. Die Phasenkontrast-Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiophot bei 100-facher Vergrößerung. Zellen mit Oxalat Oxidase Expression besitzen violett gefärbte Zellwände.

5) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Northern-Blot-Analyse

Blätter von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation (je ca. 1 g Frischgewicht, FG), beide im Fahnenblattstadium, wurden in flüssigen Stickstoff homogenisiert, bis feines Pulver entstand. Das Pulver wurde zu 3 ml RNA-Extraktionspuffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0; 0.25 M Na-EDTA; 5% (w/v) SDS) und 1,5 ml puffergesättigtem



Phenol gegeben (15 ml Plastik-Röhrchen) und gut geschüttelt. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C zentrifugiert (swing out, Heraeus Varifuge). Es wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben (ohne Überstand abzugießen) und das Röhrchen mehrere Male invertiert. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C rezentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml Plastik-Röhrchen) gegossen. Die RNA wurde durch Zugabe von 3 ml 6 M LiCl gefällt (über Nacht, 4°C). Die gefällte RNA wurde für 30 min bei 12500 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Hermle Z360K), die RNA-Pellets wurden in 500-1000 µl 70% Ethanol aufgenommen (RNA löst sich nicht) und in Eppendorf röhrchen überführt. Die Proben wurden für 10 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand abgehoben. Die RNA-Pellets wurden 5 min bei 37°C getrocknet, in 100 µl-200 µl TE aufgenommen und 5-10 min bei 75°C gelöst. Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA in formaldehydhaltigen Gelen und der Transfer auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) erfolgte gemäss Standardprotokollen (Sambrook et al., vide supra). Pro Probe wurden 10 µg RNA aufgetragen.

Die radioaktive Sondenmarkierung mit  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP erfolgte nach der Methode des „random prime labelling“ unter Verwendung eines Kits (Roche). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in CHURCH Puffer (0,5 M NaPhosphat pH 7,2; 1 % (w/v) BSA; 7 % (w/v) SDS; 1 mM  $\text{Na}_2\text{ETDA}$ ). Die Blots wurden 2 x 15 min in Waschlösung (0.1 x SSC; 0.1 % w/v SDS) bei 65°C gewaschen und anschließend für 16-48 h gegen Phosphorimager-Screens exponiert. Die exponierten Screens wurden mit einem Phosphorimagergerät (FujiFilm FLA 3000) eingescannt und als Bilddateien im TIFF Format exportiert.

#### 6) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Western-Blot-Analyse

Blattspitzen von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation, beide im Fahnenblattstadium, wurden in IWF Puffer (32 mM Na-Phosphat; 84 mM Citrat; pH 2.8; Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 15 min bei

13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 0.5 g/ml Ammoniumacetat versetzt und säurelösliche Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden in 50 µl/g FG Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Zu 20 µl Probe wurden 5 µl 4-fach konzentrierter SDS Probenpuffer zugegeben, und die Proben wurden mit soviel (1-5 µl) gesättigter Tris-Lösung versetzt, bis der Farbumschlag des Bromphenolblaus zu Blau stattfand. Pro Spur wurden 12,5 µl gekochte Probe in denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15%iges Trenngel) nach einer Standardmethode unter Verwendung von Minigelapparaturen der Firma Bio-Rad aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder Coomassie gefärbt (als Beladungskontrolle) oder nach einer Standardmethode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Die Membranen wurden nach einer Standardmethode mit einem ersten, polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:2000), gerichtet gegen das Prx8 Protein aus Gerste (ein homologes Protein zu TAPERO), inkubiert, gefolgt vom zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2000), der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und an den alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die TAPERO Proteinbanden wurden durch lokalisierte alkalische Phosphataseaktivität (BCIP/NBT Färbelösungen; Fertigtabletten (Roche)) nachgewiesen.

#### 7) Mehltaresistenz in pPS41-transgenen Pflanzen

Für den Resistenztest wurden adulte, im Gewächshaus angezogene pPS41- oder pWIR5-TaMlo-RNAi-transgene Weizenpflanzen mit voll entwickeltem, frisch geschobenem Fahnenblatt verwendet. Als Kontrollen dienten gleichzeitig angezogene Wildtyp-Pflanzen cv. Bobwhite. Die apikale Hälfte des Fahnenblattes wurde abgeschnitten und auf 0,5% (w/v) Phytoagar, der mit 20 ppm Benzimidazol versetzt war, in 20 x 20 cm grossen Polycarbonat-Schalen aufgelegt. Pro Schale wurde eine transgene Sublinie (je 20 Blätter) plus Bobwhite Wildtyp (je 6 Blätter) aufgelegt. Die Blattsegmente wurden in einem Inokulationsturm mit Mehltasporen inokuliert, indem Sporen von 4 stark inokulierten Weizenblättern in den Turm eingeblasen wurden. Nach 5 min wurden die Schalen entfernt, geschlossen und bei 20°C und

indirektem Tageslicht inkubiert. Sieben Tage nach Inokulation wurde der Mehltaubefall bonitiert unter Verwendung eines Klassenbonitusystems (Schweizer et al., 1995). Die Resistenz wurde bezogen auf die sich auf der jeweiligen Phytoagarplatte befindlichen Kontrollblätter berechnet.

#### Literatur:

Christensen and Quail (1996) Transgenic Res. 5: 213-218.

Elliott *et al.*, (2002). Molecular Plant Microbe Interactions 15: 1069-1077.

Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Schweizer, P., Vallélian-Bindschedler, L., and Mössinger, E. (1995). Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, Physiological and Molecular Plant Pathology 47, 51-66.

Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., and Dudler, R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat, Mol Plant-Microbe Interact 12, 647-654.

Spencer et al. (1990) TAG 79: 625-631.

## ANSPRÜCHE

1. Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis, umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens GSTA1 stammende Sequenz, und eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz.
2. Promotorregion nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2 handelt.
3. Promotorregion nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
  - a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Nukleinsäuresequenz umfassen,
  - b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen, und
  - c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten Bedingungen mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz hybridisiert.
4. Chimäres Gen,  
dadurch gekennzeichnet, dass es eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Sequenz enthält.
5. Chimäres Gen nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression zu einem erhöhten Gehalt des von der kodierenden Sequenz kodierten Proteins in der Epidermis führt.

6. Chimäres Gen nach Anspruch 4 oder 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz aus einem Resistenzgen stammt.

7. Chimäres Gen oder rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5 oder 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für eine Peroxidase oder eine Oxalat-Oxidase kodiert.

8. Chimäres Gen nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression die Expression des entsprechenden endogenen Gens in der Epidermis unterdrückt.

9. Chimäres Gen nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz in antisense-Orientierung vorliegt.

10. Chimäres Gen nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Unterdrückung der Expression des endogenen Gens durch RNA-Interferenz erfolgt.

11. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 8 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet, dass das endogene Gen, dessen Expression unterdrückt wird, das Mlo-Gen ist.

12. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein chimäres Gen nach einem der Ansprüche 4 bis 11.



13. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12, zusätzlich umfassend transkriptionelle Terminationssequenzen.

14. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression eines Transgens, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen

15. Transgene Pflanzen, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13 oder hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 14, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

16. Transgene Pflanzen nach Anspruch 15, bei denen es sich um monokotyledone Pflanzen handelt.

17. Transgene Pflanzen nach Anspruch 16, bei denen es sich um Poaceen handelt.

18. Transgene Pflanzen nach Anspruch 17, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

19. Verwendung einer Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur epidermisspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das Transgen ein Resistenzgen ist.
21. Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
  - b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
22. Transgene Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 21, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.
23. Transgene Pflanzen nach Anspruch 22, bei denen es sich um monokotyledone Pflanzen handelt.
24. Transgene Pflanzen nach Anspruch 23, bei denen es sich um Poaceen handelt.
25. Transgene Pflanzen nach Anspruch 24, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.
26. Transgene Pflanzen nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Resistenz gegen Echten Mehltau zeigen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotorregionen, unter deren Kontrolle Transgene in Pflanzen epidermisspezifisch exprimiert werden können. Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese Promotoren umfassen und transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die mit diesen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, und Verfahren zu deren Herstellung. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle umfassend einen erfindungsgemäßen Promotor und Nukleinsäuresequenzen bzw. Transgene, die Pathogenresistenz vermitteln können sowie mit diesen Nukleinsäuremolekülen transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen und Verfahren zu deren Herstellung.

## Abbildung 1:

### GstA1 Promotor

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC  
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC  
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGGCTGGCGTTCT  
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG  
CCGAAGAGATCCGAGTCTGGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG  
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC  
TAAGTACTTTAACTTTCCTTCTTCACATCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTG  
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTATATGCACAGTAA  
ATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG  
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA  
GGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACT  
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTCTAGCCAAACGAACTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG  
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG  
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC  
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAACTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAA  
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT  
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACA  
ACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCG  
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCAT  
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC  
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG  
ACTACTGTCGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG  
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTCACCGATGTTTGGGGGGC  
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT  
CTAACTAGTACTTACTTCCTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC  
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG  
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT  
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCCA

## Abbildung 2:

WIR1A Intron:

GTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTCAATTCCTCCCCATTTTGTAATTGATTAAGTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCT  
GAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAG



### Abbildung 3:

GstA1 Promotor mit WIR1a Exon/Intron:

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC  
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC  
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGGCTGGCGTTCT  
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG  
GCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG  
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC  
TAAGTACTTTAACTTTCCTTCTTCACATCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTG  
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTATATGCACAGTAA  
ATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG  
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA  
GGATAACGTAAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACT  
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTCTAGCCAAACGAAGTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG  
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG  
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC  
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAAGTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAA  
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT  
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACA  
ACGAGAGGGCACATTTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCG  
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACCCGGATAGCCGCCATGCAT  
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC  
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG  
ACTACTGTCGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG  
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTCACCGATGTTTGGGGGGC  
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT  
CTAACTAGTACTTACTTCCTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC  
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG  
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTCCCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT  
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTAT  
CTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGCATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCG  
AAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGATCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTT  
GGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCCGCTCAGGTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTTCATTTCCCTCCCATTTTTGTAA  
TTGATTAAGTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

#### Abbildung 4:

TAPERO cDNA:

ACCACCACACCACTCCACCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGCGAGCTAGCTAGC  
TAACCATGGCCGCCTCTGCCTCTTGCCCTTCTCTTGTTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGGCGTCEGGCGCAGCTGTCA  
CCGACCTTCTACGACACGTCTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCC  
TCGGATGGGCGCGTCGCTGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTTGCTGTCTG  
GCATGGAACAAAATGCTATCCCGAACGCGGGGTCGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAG  
GCCATCTGCAATCAGACCGTCTCCTGCGCCGACATCCTCACCGTCGCCGCCCGTGACTCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCC  
GTCATGGACAGTCCCTCTGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAAACGAGGCGGCGGCAAACAGCGACCTGCCAGGCTTTA  
CATCTAGCCGGTCAGATCTTGAGCTGGCATTGAGAAACAAGGGCCTCCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCG  
CACACCATCGGCCAGGCGCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCAC  
ATCTCTCCGGGCCAACTGCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTG  
ATAACGCCTACTACACCAACCTCATGTACAGAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACC  
GACAACACTGTCCGGAACCTTTCGCTCGAACCAGCGGCGTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAA  
CATCGCGCCGAAGACAGGCACGCAGGGGCGAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACTCGTGATTGATAGACGAGTTAC  
TGCATACTAGCCAGCACGACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAA  
CCGTGTATTTTATGTACGAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATCCCACTTTCT  
CATGCAAAGGCATGGAGAATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTA

## Abbildung 5a:

### Eigenschaften von pPS41:

Gesamtlänge:	7011 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TAPERO cDNA	3264-4509
ATG TAPERO	3348
Stop codon:	4284
Poly(A)	4510-4514
CamV 35S Terminator:	4576-4776

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG  
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA  
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGAC  
GGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGCAAGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCG  
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA  
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCC  
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC  
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG  
GGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTGGGGAGAT  
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
CTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTCTCTTCTCACA  
TCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAACCTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT  
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAACCTCGTGAGGTGTTT  
TGCCTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAACCTTCTCGATGTA  
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT  
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT  
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC  
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
AGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGCATTCACTGAATCAGAACAAAGATTAACAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA  
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA  
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT  
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA  
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCGGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG  
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
TACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT  
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA  
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTCACCGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAAATTGGTTCCGCGATCTACA  
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCCGACC  
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA  
ATTTGGCACTCATCATTTTATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG  
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG  
GCCTCCTCCCACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC  
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA  
TCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC  
GCCTCAGGTGAGTCGTCGGACGGTGTCGGTTCATTTCTCCTCCCATTTTTGTAAATTGATTAACTTGTTATACATGCTGACC  
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCGGGCTGCAGGAATTACACCACACACCACTCCA  
CCAGTAAGAAGTGACGAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGACGCTAGCTAGCTAACCATGGCCGCCTCT  
GCCTCTTGCTTTCTCTTGTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGCGTGGCGCAGCTGTACCGACCTTCTACGACAC  
GTCTTCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCTCGGATGGGCGCGTCCG  
TGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTTGCTGTCTGGCATGGAACAAAATGCT  
ATCCCGAACGCGGGGTCGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAGGCCATCTGCAATCAGAC  
CGTCTCCTGCGCCGACATCCTCACCGTCGCCGCCGTGACTCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCCGTGATGACAGTCCCTC  
TGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAACGAGGGCGGGCAACAGCGACCTGCCAGGCTTTACATCTAGCCGGTCAGAT  
CTTGAGCTGGCATTGAGAAACAGGGCCTCCTTACGATCGACATGGTGCCCTCTCGGGCGCGCACACCATCGGCCAGGC  
GCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCACATCTCTCCGGGCCAACT

GCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTTCGATAACGCCTACTACACC  
AACCTCATGTACAGAAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACCGACAACACTGTCCGGAA  
CTTTGCGTCGAACCCAGCGGCGTTTACGACGCGCCTTACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAACATCGCGCCGAAGACAG  
GCACGCAGGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTCGTGATTGATAGACGAGTTACTGCATACTAGCCAGCAC  
GACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAACCGTGTATTTTATGTAC  
GAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATTCCCACTTTCTCATGCAAAGGCATGGAG  
AATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTATAAAAAGCGGCCGCGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCG  
ACCTGCAGGCATGCCCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAAATAATGTGTGAGTAGTTCCC  
AGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTG  
TAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCGG  
CCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTG  
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA  
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC  
GTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA  
GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC  
CCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT  
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGG  
AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC  
ACGAACCCCCCGTTACGCCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA  
TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG  
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG  
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA  
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTT  
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
ATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCC  
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC  
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTG  
CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGC  
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACG  
ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA  
AGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT  
TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCTCAAT  
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAA  
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACC  
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT  
CATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT  
AGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC



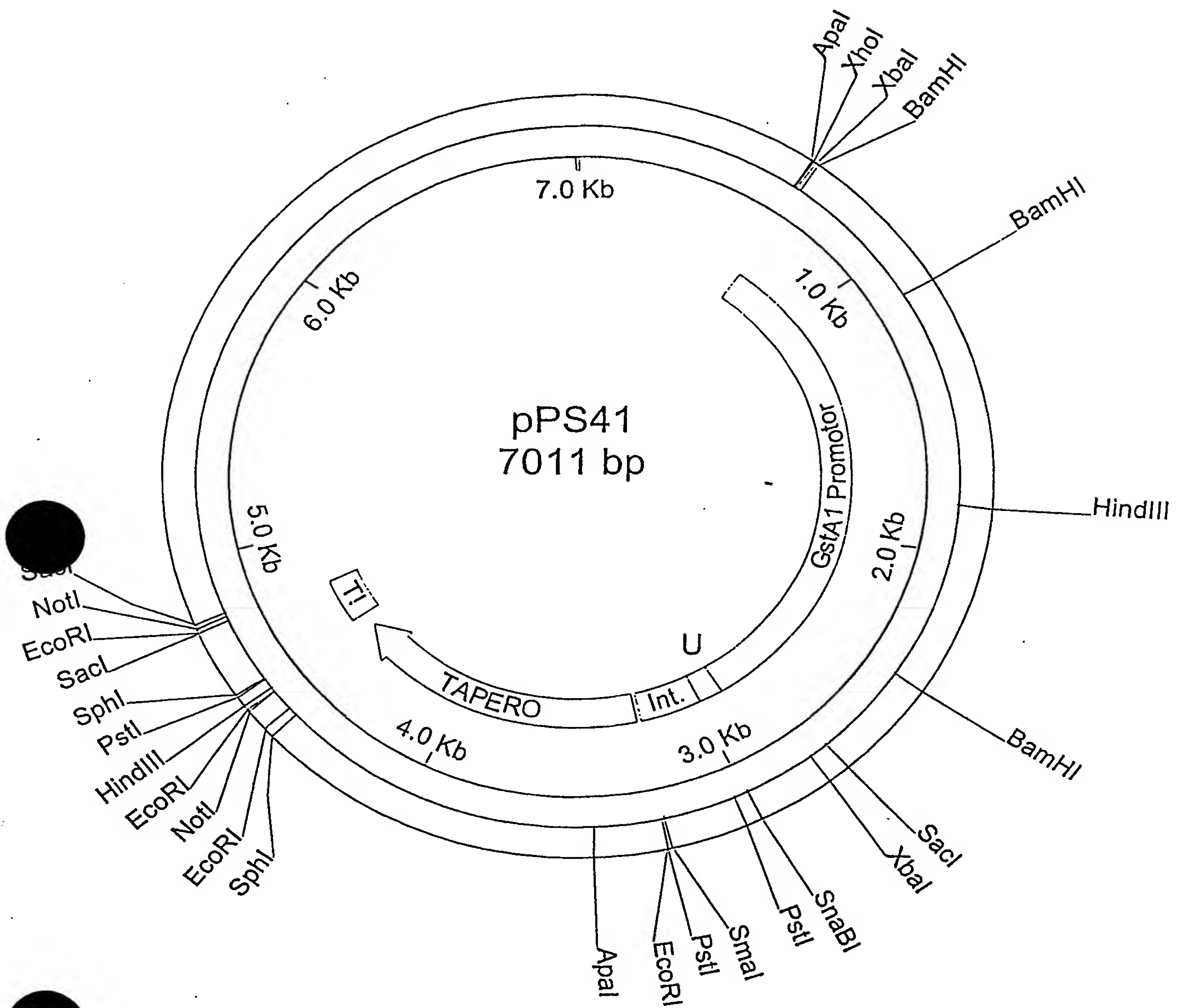


Abbildung 5b



## Abbildung 6:

Germin 9f-2.8:

AGCTTATTACATAGCAAGCATGGGGTACTCCAAAACCCTAGTAGCTGGCCTGTTTCGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCG  
TCTTGGCCACCGACCCAGACCCTCTCCAGGACTTCTGTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCAC  
ACGTGCAAGCCCATGTCTGGAGGCCGGCGACGACTTCCTCTTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGCAACACGTCCACCCC  
GAACGGCTCCGCCGTGACGGAGCTCGACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACCGCGTGG  
ACTTTGCTCCCGGAGGCACCAACCCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTT  
CTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCTCGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCGCGCCGGAGAGACGTTCTCAT  
CCCACGGGGCCTCATGCACTTCCAGTTCAACGTCGGTAAGACCGAGGCCTCCATGGTCGTCTCCTTCAACAGCCAGAACC  
CCGGCATTGTCTTCGTGCCCCCTACGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCCATCCCAACGCCGGTGCTCACCAAGGCACTCCGG  
GTGGAGGCCAGGGTCGTGGAAGTTCTCAAGTCCAAGTTTGCCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGAT  
AATTATATAATTCCATATATGCATGC

## Abbildung 7a:

### Eigenschaften von pPS24:

Gesamtlänge:	6452 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
Germin 9f-2.8 Gen	3258-4003
ATG Germin	3277
Stop codon:	3949
CamV 35S Terminator:	4017-4210

#### Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG  
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA  
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
GGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCCATTCAGGCTGCG  
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA  
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCC  
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC  
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG  
GGGTGCGCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGGAGAT  
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
CTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAAGTTCTTCTTCTCACA  
TCCACCTGATTCAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT  
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTT  
TGCCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTA  
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT  
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTGGCAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT  
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAGTGATGTGTCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC  
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
AGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA  
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA  
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT  
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA  
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACCGGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG  
CTCAAGTGACACTGTATGTCGCCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
TACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT  
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA  
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTACCGATGTTTGGGGGGCTGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACA  
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCTGCACC  
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA  
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG  
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG  
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC  
ATCCATCAGGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA  
TCGCTCTCTTCGTGCTCGTCCGCGATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC  
GCCTCAGGTGAGTCGTGCGGACGGTGTCCGTTTCTTCTCCCATTTTTTGTAAATTGATTAAGTTGTTATACATGCTGACC  
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGGGATCCAGCTTATTACATAGCAAGCATGG  
GGTACTCCAAAACCTAGTAGCTGGCCTGTTGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCGTCTTGGCCACCGACCCAGACCCT  
CTCCAGGACTTCTGTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCACACGTGCAAGCCCATGTGCGAGGC  
CGGCGACGACTTCTTCTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGCAACACGTCCACCCCGAACGGCTCCGCCGTGACGGAGC  
TCGACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCATGAACCGCGTGGACTTTGCTCCCGGAGGCACCAAC  
CCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTTCTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCT  
CGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCAGCGCGGAGAGAGCTTCTCATCCCACGGGGCCTCATGCACTTCC  
AGTTCAACGTGCGTAAGACCGAGGCTCCATGGTCGTCTCTTCAACAGCCAGAACCCCGGCATTGTCTTCTGCCCCCTC  
ACGCTCTTCCGGCTCCAACCCGCCATCCCAACGCCGGTGTACCAAGGCACTCCGGGTGGAGGCCAGGGTCTGGAAGT  
TCTCAAGTCCAAGTTTGCCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGATAATTATATAATCCATATATGCA

TGCCTGCAGGCATGCCCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCC  
CAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTT  
GTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCG  
GCCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT  
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG  
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA  
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT  
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA  
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC  
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT  
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGG  
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG  
CACGAACCCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT  
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT  
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT  
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA  
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGATTT  
TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA  
TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC  
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC  
CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT  
GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCG  
CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAAC  
GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGT  
AAGTTGGCCGCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT  
TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA  
TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAACTCTCA  
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTAC  
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC  
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT  
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

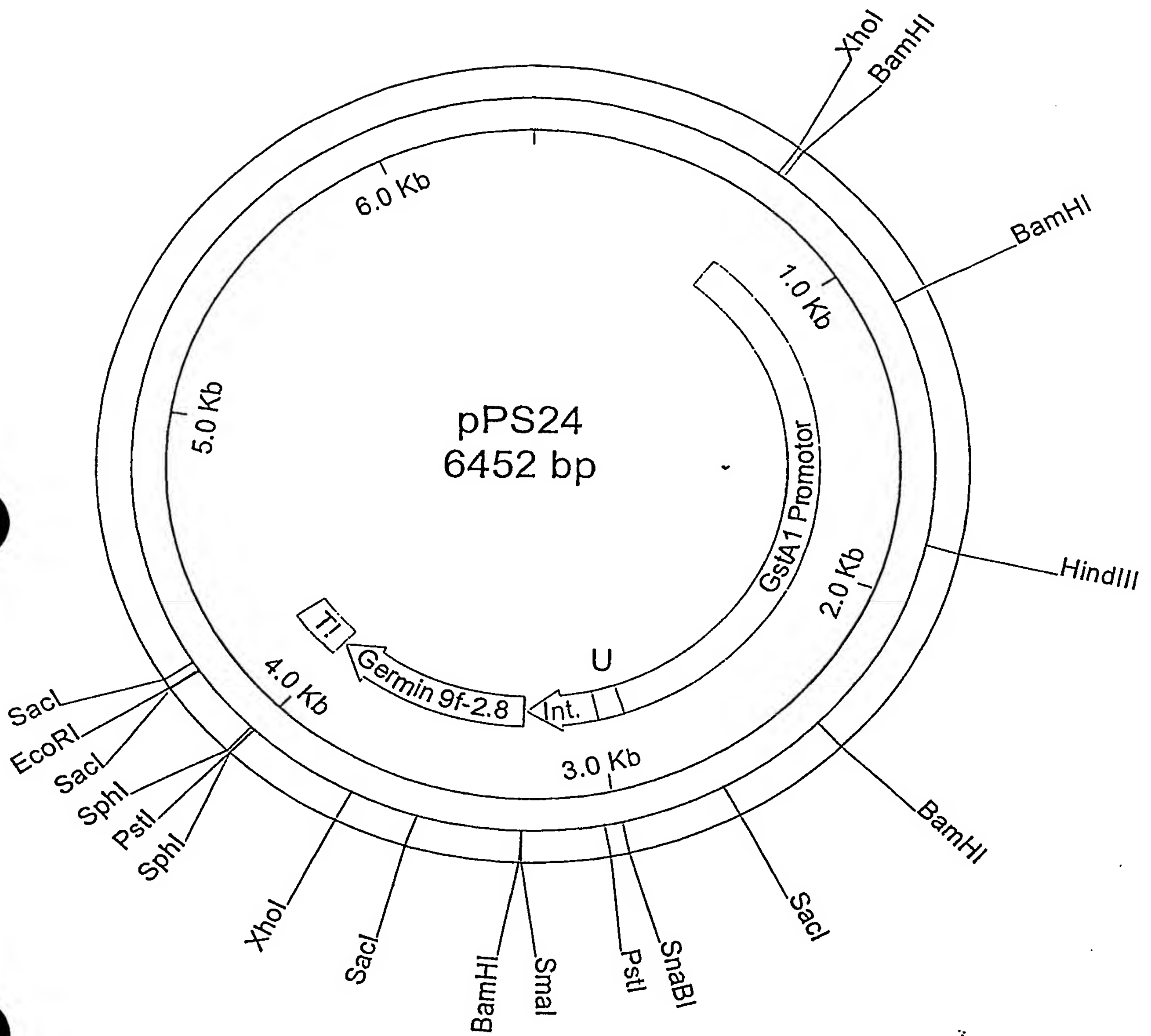


Abbildung 7b

## Abbildung 8:

TaMlo inverted repeats and MlaI Intron:

CCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGAAACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGG  
CGGTGGAACCAGAAGAACTTGTTGCTGGGCTCGACCACGGGTGCCCCCTTGATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAG  
GGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCTTGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGA  
GTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAGAGGGTGAGGATCGCCACAGCCCACAGCGGGAGGCTGCGAAAAGAGGCCAAA  
TGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGCAGGGGGCAAAGACCATGACGCAGCAAACCTGATAGTATTGTATCATATGGAAG  
CTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGACACTCGTGCCGAATTGATTTCGTGAATTTCTAGAGAACAAGGTATGCATC  
AATTTAGAAAAAAGTACACTATTATGTGATGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTTTCATTAAGG  
TCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACACTAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATAT  
ATATATATATATGTTTGATTCTTTCCGGCTTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTGCATTTGTTCCAACGGCTGA  
ATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCATCTAAATGTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAAT  
AATAAACCAAAGGAGAGGAAGGAAAGAGGAAGATAAATGTTACAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCT  
TACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTATATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCTTGAAAATTCCTAAA  
ATATTGTACATTTGACTGATGACCAAACAAAAGTTAAATTGTCTCTTCCTTATCACATTATATTTCCATGCATGCCTTT  
TTCTGGAAACTTACTATCAGCAAAATTTAGATGAAAGGATAATGCCACATAATTTAGTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTG  
TCATATATTAAATTGGTGGGCCAATCTATTCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAAT  
TGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAAACCTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCATTTT  
GTTTCATCATACGATTGGAGGCCATAATAGATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCCAAACACATGCTTCTTACTA  
GTGTTGAATATATACCCTTTTAGATGTATAGTTCAACCCATAGATTTCATATGACCCTCAGCTTTCTGATGTGTATGTATG  
ACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTAGGTATCTTGTCCTGCAGGAATTCGGCACGAGTGTGTCGTCAGGCTCCATATGA  
TATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATACTATCAGTTTGCTGCGTCATGGTCTTTGCCCCCTGCTGGTCTTGTGTCATGA  
TCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGCAGCCTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCTCTTCCTTGATATCGACGGG  
ATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTCATCCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCAT  
GGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGTGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTCGAGCCCAGCAACAAGTTCTTCT  
GGTTCCACCGCCCCGACTGGGTCTCTTCTTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTTCGTG  
TGGACAGGCATGCGACTGG



## Abbildung 9a:

### Eigenschaften von pWIR5-TaMlo-RNAi:

Gesamtlänge:	7633 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TaMlo IR1	3252-3556
Intron Mla1	3698-4731
TaMlo IR2	4877-5190
CamV 35S Terminator:	5191-5391

#### Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCG  
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA  
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGAC  
GGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCCATTCAGGCTGCG  
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA  
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAAGTAGTGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCC  
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC  
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG  
GGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCGCGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTGGGGAGAT  
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
CTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCTTCTCACA  
TCCACCTGATTGAGTATTTTGTATCTAAATTAAGTTCGAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT  
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTT  
TGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTA  
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT  
CCACTCTAGCCAAACGAACATTTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT  
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTGCGCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC  
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
AGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGCATTCACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA  
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA  
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT  
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA  
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCCGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG  
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
TACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTACTAGCTGACTACTGTCGCTTACCTGCCTTCCCTT  
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAAATTTGAA  
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTACCGATGTTTGGGGGGCTGTCGGAATTTGGTTCCGCGATCTACA  
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCCGACC  
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA  
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG  
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG  
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC  
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA  
TCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC  
GCCTCAGGTGAGTCGTCGCGACGGTGTCCGTTTCTTCTCCCATTTTTTGTAAATGATTAACTTGTATACATGCTGACC  
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGCCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGA  
AACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGGCGGTGGAACCAGAAGAACTTGTGCTGGG  
CTCGACCACGGGTGCCCCCTTGATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAGGGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCT  
TGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGAGTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAG  
AGGGTGAGGATCGCCACAGCCACAGCGGGAGGCTGCGAAAAGAGGCCAAATGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGC  
AGGGGCAAAGACCATGACGCAAGCAACTGATAGTATTGTATCATATGGAAGCTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGAC  
ACTCGTGCCGAATTCGATTCGTGAATTTCTAGAGAACAAAAGGTATGCATCAATTTAGAAAAAGTAACTATTATGTGA  
TGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTCATTAAGGTCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACAC

TAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATATATATATATATATGTTTGATTCTTTCCGGC  
TTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTGCATTTGTTCCAACGGCTGAATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCAT  
CTAAATGTTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAATAATAAACCAAAGGAGAGGAAGGAAAGAG  
GAAGATAAATGTTACAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCTTACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTAT  
ATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCTTGAAAATTCCTAAAATATTGTACATTTGACTGATGACCAAACA  
AAAAGTTAAATTGTCTCTTCTTATCACATTATTTCCATGCATGCCTTTTTCTGGAACTTACTATCAGCAAATTTA  
GATGAAAGGATAATGCCACATAATTTCACTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTGTCATATATTAAATTGGTGGGCCAATCTAT  
TCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAATTGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAA  
AACTTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCAATTTGTTTCATCATAACGATTGGAGGCCATAATA  
GATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCAAACACATGCTTCTTACTAGTGTGTAATATATACCCTTTTAGATGTAT  
AGTTCAACCCATAGATTATCATATGACCCTCAGCTTTCTGATGTGTATGTATGACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTA  
GGTATCTTGTCTGCGAGGAATTCGGCACGAGTGTGCTCAGGCTCCATATGATATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATAC  
TATCAGTTTGTGCTGCGTCATGGTCTTTGCCCTGCTGGTCTTGTGTCATGATCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGCAGC  
CTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCTCTTCTTGATATCGACGGGATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTTCAT  
CCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCATGGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGT  
CGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTTCGAGCCAGCAACAAGTTCTTCTGGTTCCACCGCCCCGACTGGGTCTCTTC  
TTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTTCGTGTGGACAGGCATGCGACTGGGCATGCCCCG  
TGAAATCACCAAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCCAGATAAGGGAATTAGGGT  
TCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAATACTTCTATCAAT  
AAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCGGCCGCGAGCTCCAGCTTTT  
GTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC  
ACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT  
TGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA  
GAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCGGCTGCGGCGAGCG  
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGG  
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA  
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC  
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA  
TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACG  
CCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA  
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT  
CCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA  
AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG  
ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC  
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC  
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCTCCA  
TCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCT  
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATG  
ATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTAT  
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC  
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCC  
ACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA  
GATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA  
AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCA  
ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAATAAACAATAG  
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

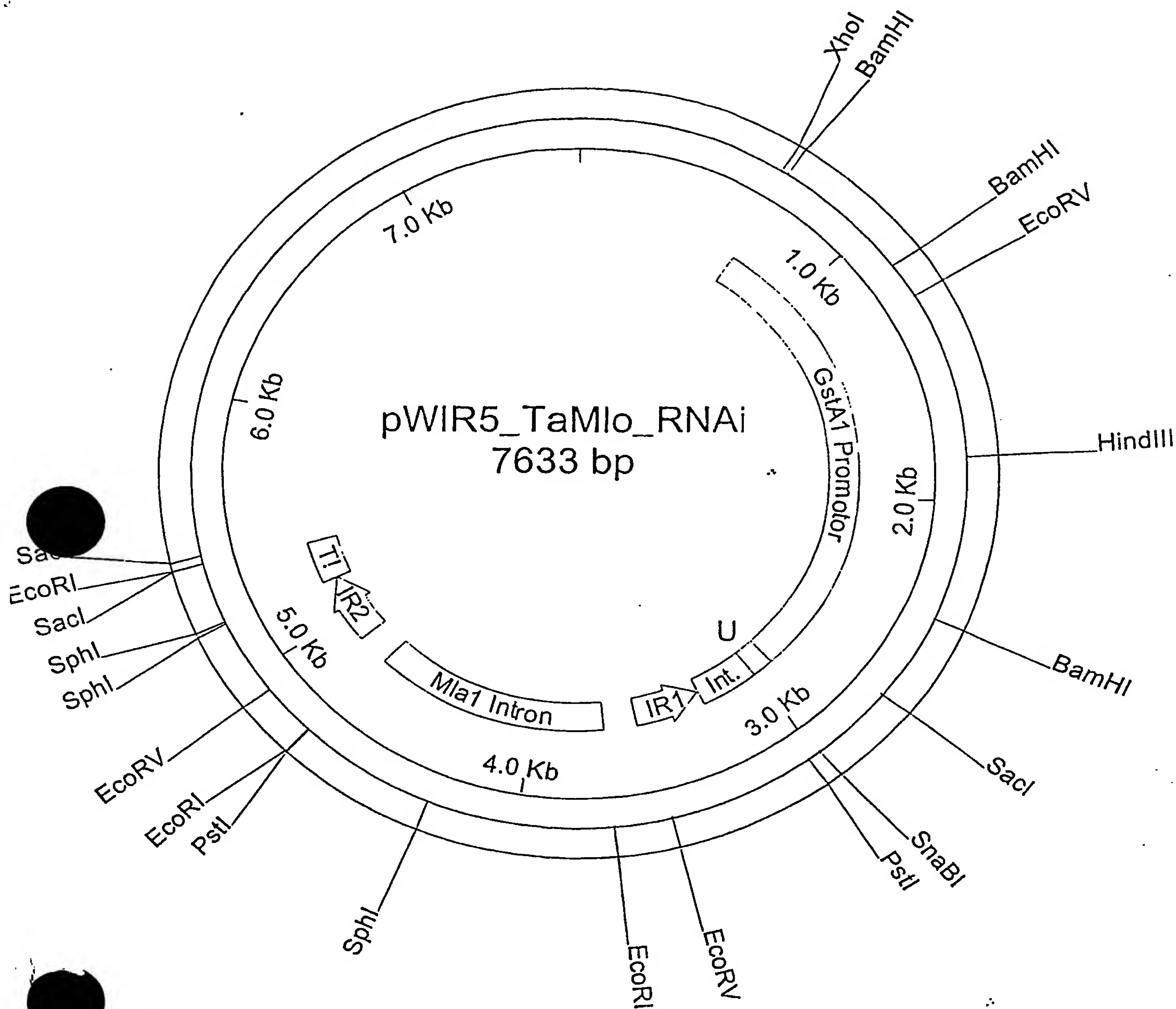
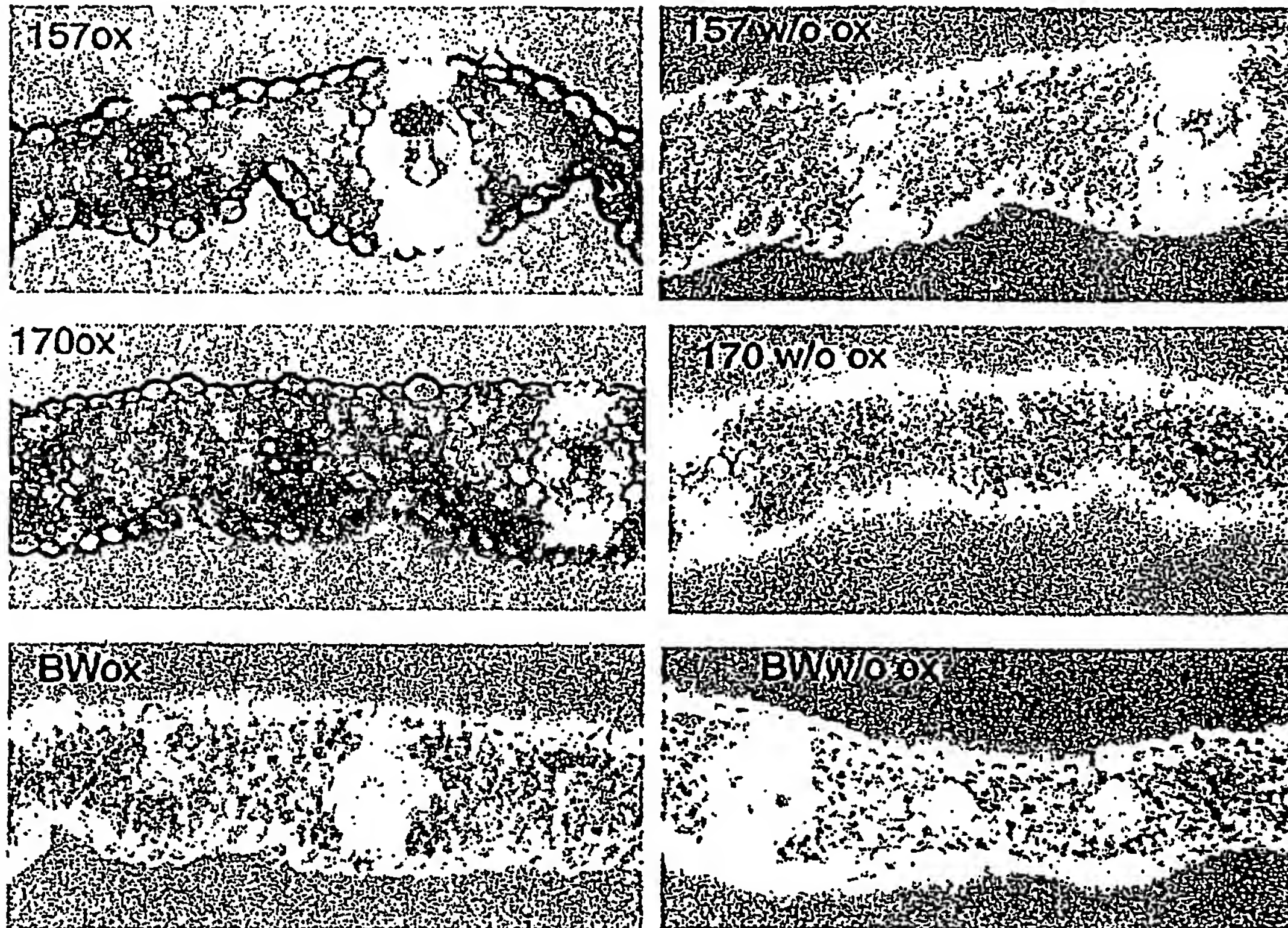


Abbildung 9b



Abbildung 10:

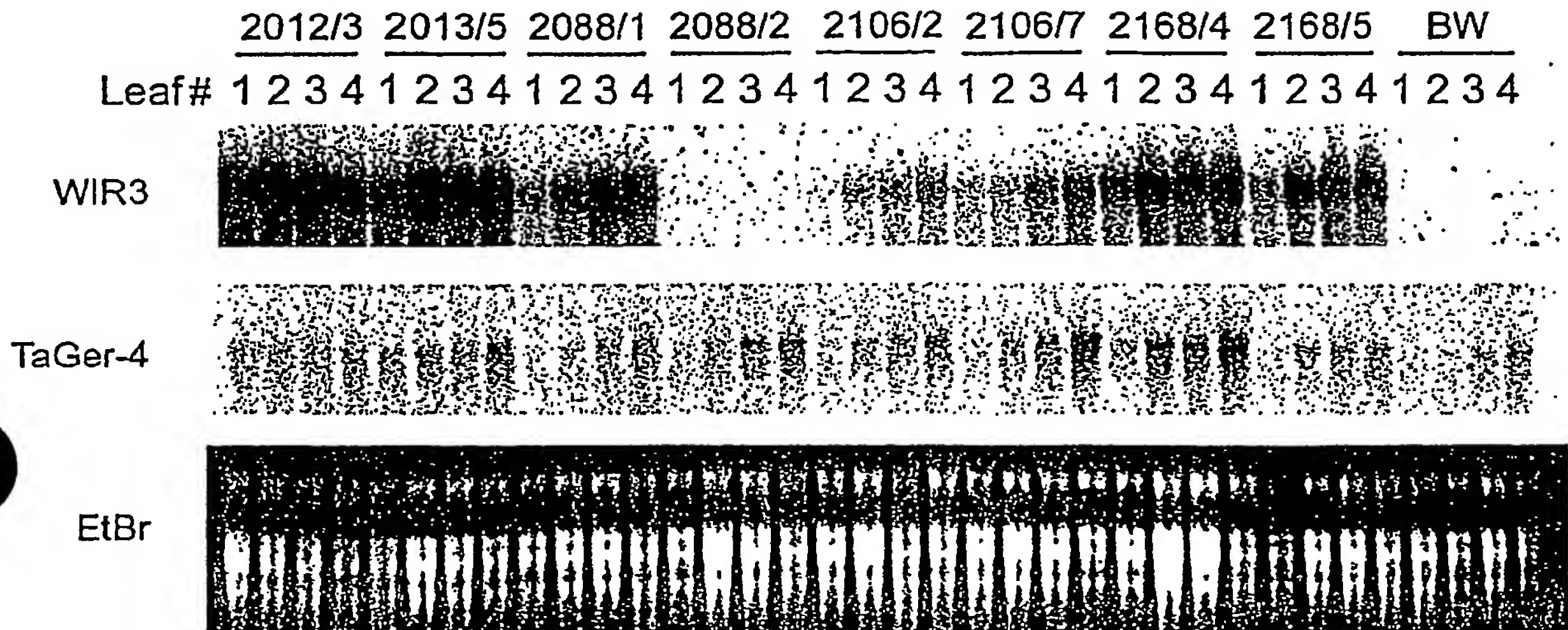
*In situ* Oxalat-Oxidase-Aktivität in Pflanzen, die das pPS24 Konstrukt tragen:



Blätter von Bobwhite Wildtyppflanzen (BW) und von transgenen Linien Nr.157 und Nr. 170 wurden querschnitten und Oxalatoxidase-Aktivität *in situ* nachgewiesen. Linke Spalte = Reaktion mit Oxalat-Substrat; rechte Spalte = Kontrollreaktion ohne Oxalat-Substrat. Die starke Violett-färbung zeigt Oxalatoxidase-Aktivität in der Epidermis der transgenen Linien an.

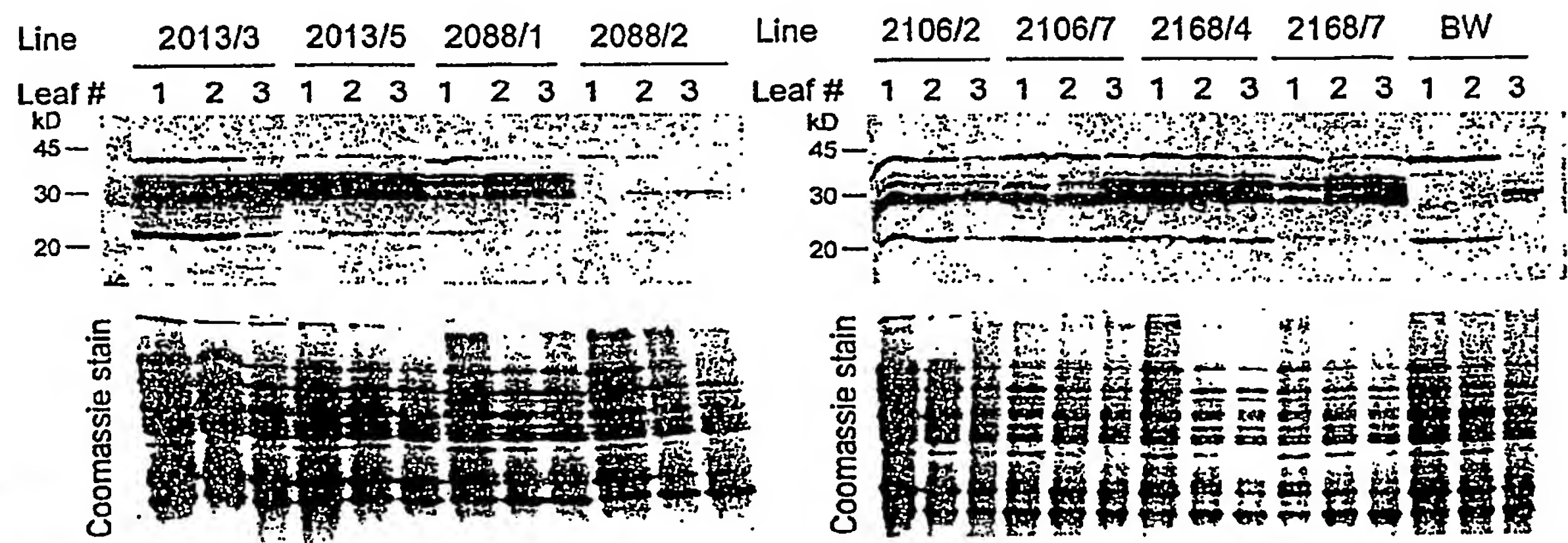
Abbildung 11:

a) Nachweis der TAPERO-RNA in transgenen Linien, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Nachweis von TAPERO RNA Akkumulation mittels Hybridisierung einer WIR3 Probe an Northern blots aus transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41 Konstrukt tragen. Je 2 Sublinien von 4 ausgewählten Linien plus Wildtyp (BW) wurden im Adultpflanzenstadium analysiert. Blatt 1 = Fahnenblatt. Blätter 2-4 = zunehmend älter. Die TaGer-4 Sonde hybridisiert an eine Gruppe von stressinduzierten Weizengenen und wurde verwendet, um pleiotrope Nebeneffekte der TAPERO Überexpression zu testen. Keine signifikante Nebenwirkung wurde gefunden. EtBr = Beladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Ethidiumbromid.

b) Nachweis des TAPERO-Proteins in transgenen Linien, die das pPS41-Konstrukt tragen

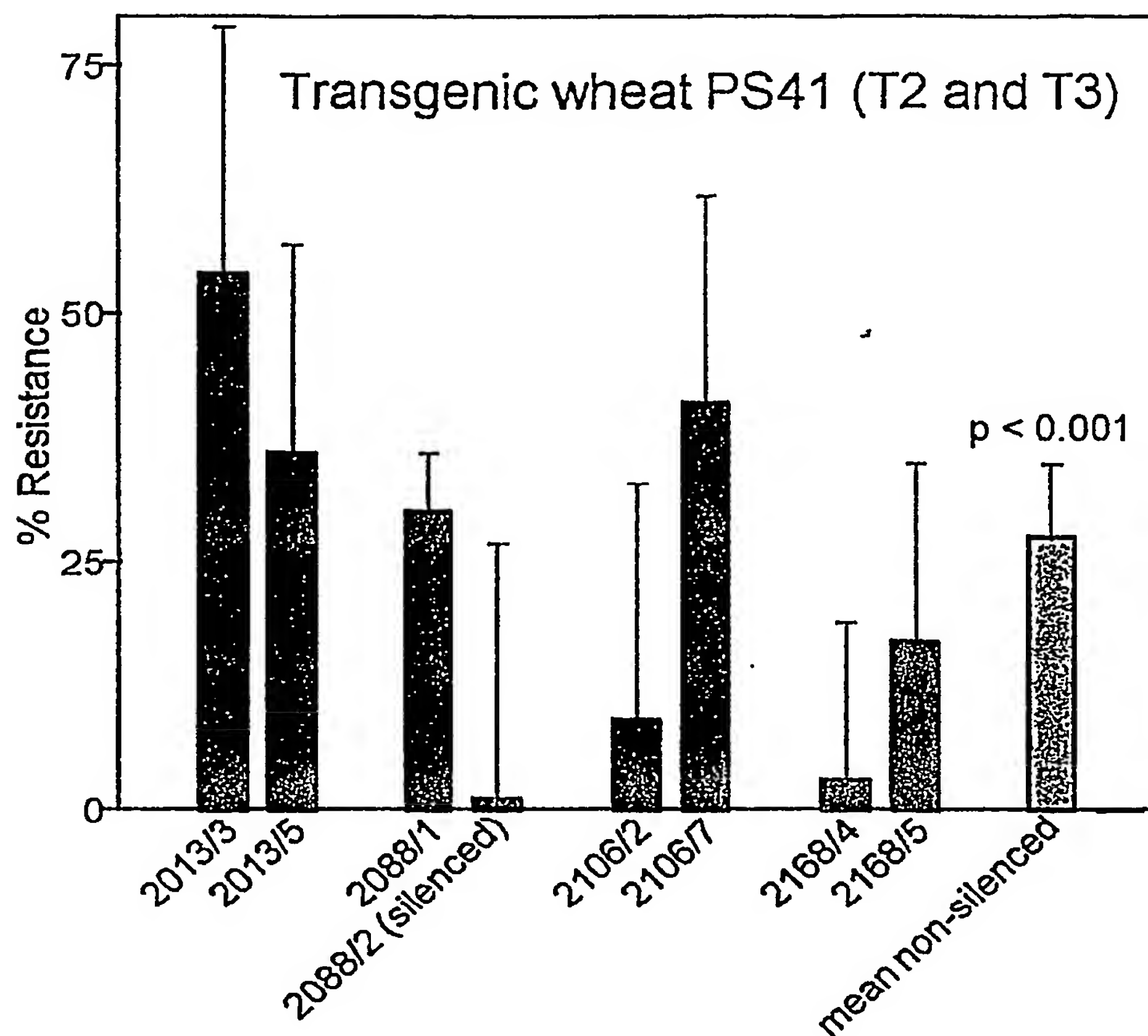


Nachweis der Akkumulation des TAPERO-Proteins mittels Antikörperreaktion auf Western Blots von transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41 Konstrukt tragen. Das TAPERO Transgenprodukt hat eine erwartete Grösse von 31 kD. In Bobwhite, Blatt 3 ist erhöhte Basalaktivität des TAPERO Gens zu beobachten. Blatt 1 = Fahnenblatt. Coomassie stain = Ladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Coomassie Blau R250.



Abbildung 12:

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mean non-silenced = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

Abbildung 13:

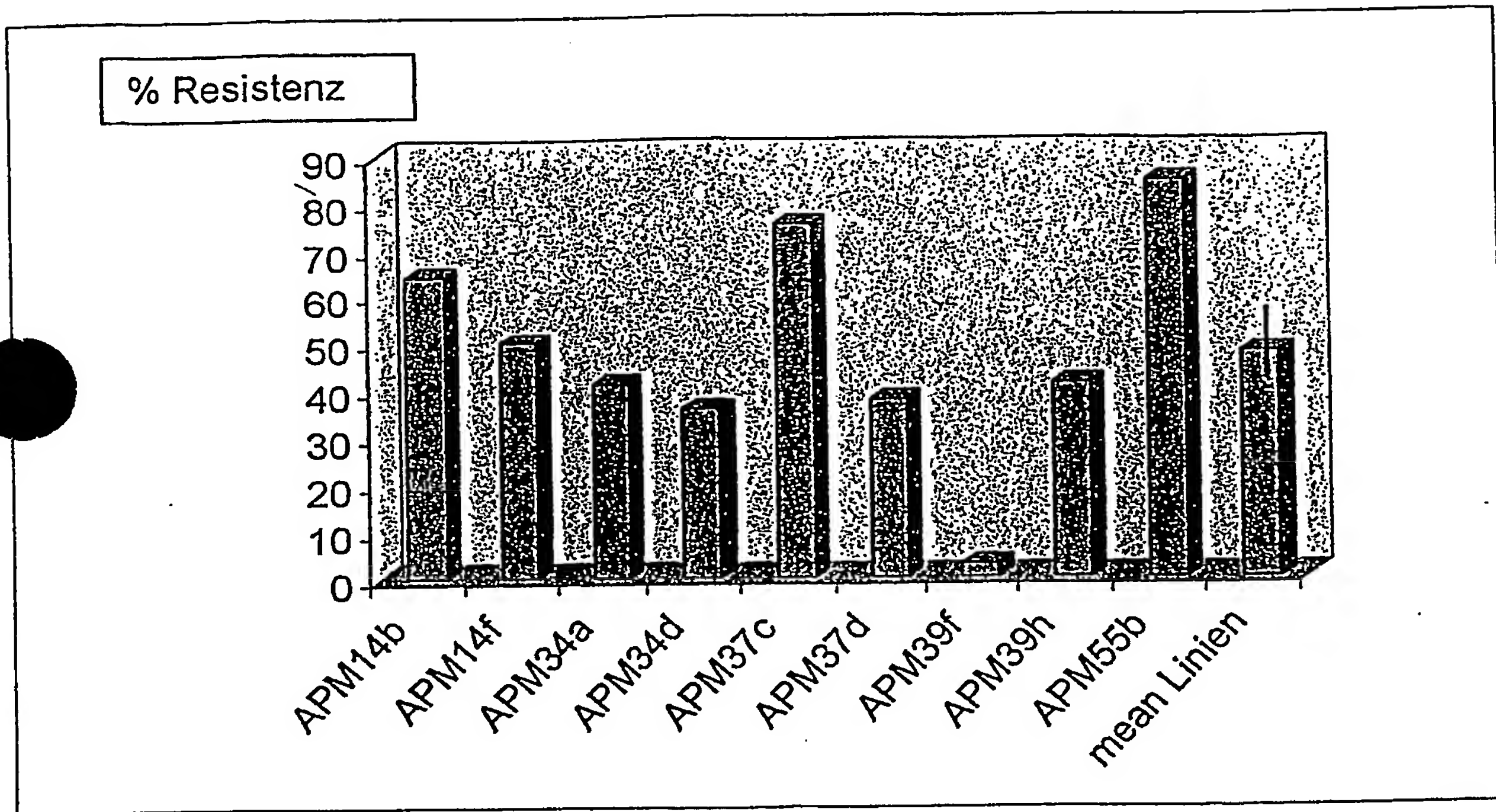
Normaler Wachstumsphänotyp transgener Pflanzen, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

Abbildung 14:

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pWIR5-TaMlo-RNAi Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem "detached leaf assay" mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/011214

International filing date: 07 October 2004 (07.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 103 46 611.8  
Filing date: 07 October 2003 (07.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 18 February 2005 (18.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**